

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501279

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子 PHLDA3 による癌遺伝子 Akt 抑制機構の解明：抗癌剤開発を目指して

研究課題名(英文) Repression of the Akt pathway by a novel tumor suppressor gene PHLDA3 -towards development of tailor-made therapies-

研究代表者

大木 理恵子 (Ohki, Rieko)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：70356252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：多くのがんで機能喪失が認められるp53経路の研究は、がん制御機構を解明する上で重要である。我々はp53の機能解析を通して、Akt抑制因子をコードする新規がん抑制遺伝子PHLDA3を同定した。PHLDA3遺伝子は、膵臓の神経内分泌腫瘍(NET)において高頻度にLOHが認められ、その頻度は膵NETのがん抑制遺伝子として有名なMEN1遺伝子と同等であった。一方、残ったアレルはPHLDA3遺伝子プロモーターメチル化が起こり、LOHとメチル化という2hitによって機能が失われていた。また、PHLDA3欠損マウスでは、神経内分泌細胞から構成される膵ランゲルハンス島の過形成が高頻度で発生する。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs) are a rare pathology and molecular mechanisms underlying their development have not been well defined. We showed that a 2-hit inactivation of the PHLDA3 gene is required for PanNET development: methylation of the locus and loss of heterozygosity. PHLDA3 functions as a suppressor of PanNETs via repression of Akt activity and downstream Akt-regulated biological processes. In addition, the tumor-suppressing pathway mediated by MEN1, a well-known suppressor of PanNETs, is dependent on the pathway mediated by PHLDA3, and inactivation of PHLDA3 and MEN1 cooperatively contribute to PanNET development. Novel PHLDA3-mediated pathway of tumor suppression that is important in the development of PanNETs is demonstrated, and the findings may contribute to personalized medicine of PanNET patients.

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：p53 Akt

## 1. 研究開始当初の背景

多くのがんにおいて、がん遺伝子 Akt が活性化している事が知られており、Akt 活性化はがん化を強く促進する要因の一つであると考えられている。Akt は正常細胞ではがん抑制遺伝子 p53 によって、活性化が抑制されている。ところが、がんのほとんどのものではがん抑制遺伝子 p53 の機能不全が認められており、がん細胞では Akt が抑制されなくなっている。

我々は、これまで機能未知であった PHLDA3 遺伝子が、p53 によって誘導される遺伝子である事を見だし、PHLDA3 が p53 による Akt 抑制を担う重要な遺伝子である事を初めて明らかにした。PHLDA3 タンパク質は、Akt タンパク質の活性化に必須な細胞膜局在を阻害する機能がある。がん抑制において、非常に強いがん化能を持つ Akt の活性を制御する事はとても重要である。実際に PHLDA3 の発現を抑制した細胞では Akt の異常な活性化が認められるとともに細胞ががん化している事が示された。さらに、ヒト肺がんにおいて PHLDA3 遺伝子の高頻度な欠損が認められた。これらのがん組織では正常組織と比較して PHLDA3 の発現低下と Akt 活性の上昇が認められ、PHLDA3 の異常ががん化の原因となっている可能性が考えられた (Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009)。

肺がんを始めとして、ほとんどのがんで Akt は異常に活性化している。PHLDA3 は Akt を直接抑制する事ができるため、PHLDA3 研究は、これらのがんの治療や診断法の開発につながる事が期待される。

## 2. 研究の目的

がん遺伝子 Akt は多くのがんにおいて異常に活性化しており、Akt 活性化はがん化を強く促進する要因の一つである。Akt は正常細胞ではがん抑制遺伝子 p53 によって、活性化が抑制されている。ところが、がんのほとんどのものではがん抑制遺伝子 p53 の機能不全が認められており、がん細胞では Akt が抑制されなくなっている。

我々は、これまで機能未知であった PHLDA3 遺伝子が、p53 によって誘導される遺伝子である事を見だし、PHLDA3 が p53 による Akt 抑制を担う重要な遺伝子である事を初めて明らかにした (Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009)。PHLDA3 遺伝子は、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質 (PIPs) との結合に働く PH ドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。一方、Akt も PH ドメインを持つタンパク質であり、活性化には PH ドメインを介して細胞膜に局在する事が必須である。PHLDA3 は、Akt のいわば内在的に発現する dominant negative 体として機能し、Akt と PIPs との結合を直接阻害する。その結果、Akt の細胞膜局在は阻害され、下流の生存シグナルは伝達されない。

当該研究期間内に、PHLDA3 と結合す

る因子を探索するとともに、PHLDA3 の構造解析を行いたいと考えている。これらの実験により、PHLDA3 が特異的に Akt を阻害するメカニズムを解明し、Akt を標的とした分子標的抗がん剤の開発に発展させたい。

## 3. 研究の方法

### 平成 23 年

1. PHLDA3 タンパク質の構造解析を行う。  
大腸菌で発現させた PHLDA3 タンパク質を用い、X 線結晶構造解析あるいは核磁気共鳴法による解析を行うための条件検討を行う。

2. PHLDA3 結合タンパク質を精製する。  
PHLDA3 タンパク質複合体を精製し、複合体の構成因子を Mass spectrometry により解析する。

### 平成 24 年

1. PHLDA3 タンパク質の構造を明らかにする。  
前年度に決定した条件に基づき、PHLDA3 タンパク質の構造解析を行う。

2. PHLDA3 タンパク質複合体の構成因子を明らかにする。

同定した PHLDA3 タンパク質複合体のそれぞれの因子と PHLDA3 の結合様式を明らかにし、PHLDA3 が特異的な Akt の抑制因子として機能するメカニズムを解明する。

### 平成 25 年

1. Akt を抑制する新規抗がん剤の開発を行う。  
明らかになった PHLDA3 タンパク質構造と同定された PHLDA3 結合タンパク質の情報をもとに、特異的に Akt を抑制するペプチドや低分子化合物を創製する。

## 4. 研究成果

本研究は、2009 年にこれまで機能が未知であったがん抑制遺伝子 PHLDA3 が、がん遺伝子 Akt を抑制する事を見いだしたことから始まる (Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009)。Akt はがん細胞内ではがん化促進シグナルの伝達に関わる遺伝子である。今回、54 個の腓神経内分泌腫瘍サンプル全てに対して遺伝子解析を行ったところ、70%に PHLDA3 遺伝子の部分欠損が認められ、非常に高頻度に PHLDA3 遺伝子の異常が起きていることが明らかになった。また、PHLDA3 遺伝子が欠損したマウスを解析したところ、膵臓の内分泌細胞の異常増殖が認められる事を明らかにした。これらことから、PHLDA3 遺伝子による Akt ががん化促進シグナルの抑制が膵神経内分泌腫瘍抑制において中心的な役割を持つと考えられる。実際に PHLDA3 遺伝子の部分欠損による機能喪失が認められた膵神経内分泌腫瘍は、悪性度が高く、予後が悪い傾向が認められた。その一方で、PHLDA3 遺伝子の機能喪失は Akt の活性化を引き起こすため、PHLDA3 遺伝子の機能喪失が認められた患者に対して Akt 経路の阻害剤であるエベロリムスが有効である可能性があると考えられる。今後の展望: PHLDA3 遺伝子の部分欠損は膵神経内分泌腫瘍患者の予後と相関があり、今後、

PHLDA3 遺伝子の診断で患者さんの予後予測ができるようになる可能性がある。また、本研究によって Akt 経路の阻害作用を有するエベロリムスの膵神経内分泌腫瘍に対する作用メカニズムが解明されたことで、エベロリムスの効果が期待できる患者さんを特定することが可能となり、膵神経内分泌腫瘍患者の個別化医療に貢献することが期待される。神経内分泌腫瘍は、ペプチドホルモンを分泌する神経内分泌細胞に由来するがんであり、膵臓を始めとして、下垂体や甲状腺、肺などに生じるが、膵臓以外にも PHLDA3 遺伝子はがん抑制的に機能すると考えられることから、本研究は臓器を超えた神経内分泌腫瘍共通のがん抑制メカニズムの解明につながるものと考えている。

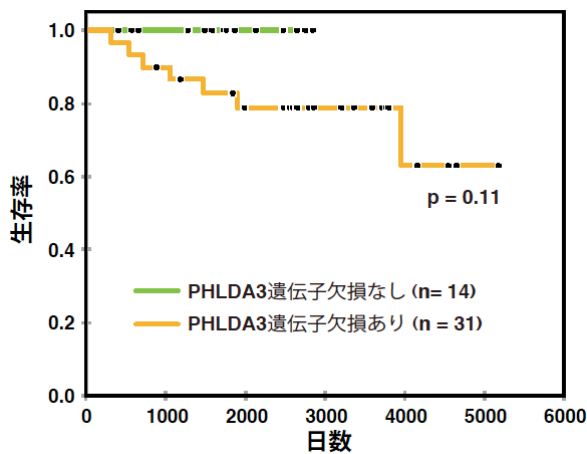


図 1: PHLDA3 遺伝子の部分欠損がある患者の予後は悪い

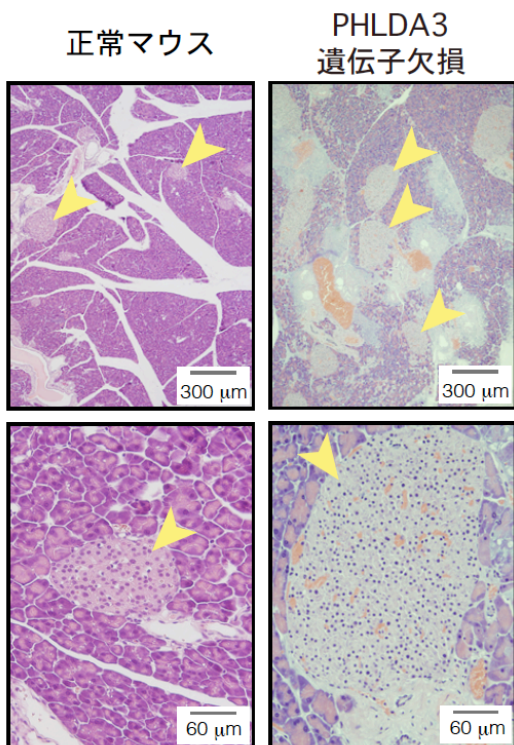


図 2: 正常マウス (左) と PHLDA3 遺伝子欠損マウス (右) との膵臓組織の比較  
PHLDA3 遺伝子欠損マウスではランゲルハンス島 (膵臓の内分泌器官) が異常に大きい。

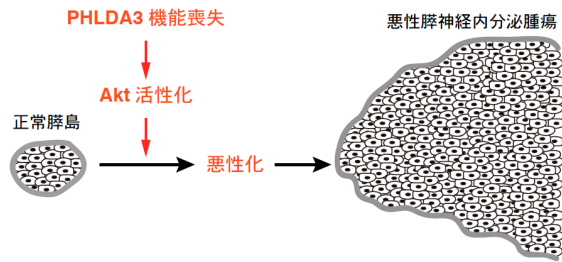


図 3: PHLDA3 機能の喪失による Akt の異常な活性化が膵神経内分泌腫瘍の悪性を促進する

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Rieko Ohki (**corresponding author**), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase<sup>3</sup>, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata\* and Hitoshi Nakagama\*. (\*These authors equally contributed to the work) PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. *PNAS*, 111(23), E2404-E2413, 2014.

査読あり

2. Toshitsugu Fujita, Yoshinori Asano, Junko Ohtsuka, Yoko Takada, Kazunobu Saito, Rieko Ohki, Hodaka Fujii. Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Scientific Reports*, 3, doi: 10.1038/srep03171.

査読あり

3. Chikako Ozeki, Tatsuhiro Shibata, Takashi Kohno, Yuichiro Sawai, Koji Okamoto, Jun Yokota, Fumio Tashiro, Seiichi Tanuma, Ryuichi Sakai, Tatsuya Kawase, Issay Kitabayashi, Yoichi Taya and Rieko Ohki<sup>#</sup>. (**#corresponding author**) Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.

査読あり

286, pp. 18251-18260, 2011.  
査読あり

〔学会発表〕(計 37 件)

1. China-Japan Symposium on Cancer Research, 2011 年 5 月

Rieko Ohki, PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt

2. 第 70 回日本癌学会学術総会、シンポジウム発表、2011 年 10 月

大木理恵子「PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt」

3. 日仏がんワークショップ、発表、2011 年 11 月

大木理恵子「PH domain-only protein PHLDA3; a p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of endocrine tumors」

4. 平成 23 年度 個体レベルでのがん研究支援活動 ワークショップ、口頭発表、2012. 1. 19

PH domain-only protein PHLDA3 は Akt の新規抑制因子であり内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である

5. がん研セミナー、口頭発表、2012. 2. 14

PH domain-only protein PHLDA3 は Akt の新規抑制因子であり内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である

6. 第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2011. 12. 15

Novel p53 target gene p53PAD1 regulates glycosylation and suppresses tumorigenesis

7. 第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2011. 12. 15

Development of candidate anticancer drug targeting p53 regulators Mdm2 and Mdmx

8. 第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2011. 12. 15

Novel p53 target gene p53PAD5 is a regulator of HSF1

9. 第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2011. 12. 15

Unraveling the molecular mechanism of Akt inhibition by PHLDA3

10. 第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2011. 12. 13

Generation of anti-p53 scFv by immunization with partial peptide using

Rapid Antibody Isolation System (RantIS)

11. 平成 23 年度 個体レベルでのがん研究支援活動 ワークショップ、ポスター発表、2012. 1. 19

がん抑制遺伝子 PHLDA3 と膵内分泌腫瘍

12. 第 71 回日本癌学会学術総会、シンポジウム発表、2012. 9

大木理恵子「PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt」

13. 第 35 回日本分子生物学会年会、ワークショップ発表、2012. 12

大木理恵子「PH domain-only protein PHLDA3 は Akt の新規抑制因子をコードする内分泌腫瘍の新型がん抑制遺伝子である」

14. 第二回日中がん研究シンポジウム会、ポスター発表、2012. 5

Novel p53 target gene p53PAD5 is a regulator of HSF1

15. 第二回日中がん研究シンポジウム会、ポスター発表、2012. 5

Pancreatic islet hyperplasia in mice deficient for PHLDA3, a candidate tumor suppressor gene of endocrine tumors

16. 平成 24 年度 がん若手研究者ワークショップ、ポスター発表、2012. 9

新規 p53 標的遺伝子 p53PAD5 は HSF1 活性の制御因子である

17. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2012. 12

癌抑制遺伝子 p53 を標的とした新規抗癌剤の創製

18. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2012. 12

Akt 抑制遺伝子 PHLDA3 は新規膵内分泌腫瘍抑制遺伝子である～PHLDA3 遺伝子欠損マウスにおける膵ランゲルハンス島細胞の過形成～

19. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2012. 12

新規 p53 標的遺伝子 p53PAD5 は HSF1 活性の制御因子である

20. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2012. 12

p53 アイソフォーム  $\Delta 1stTAD$ -p53 標的遺伝子の同定と機能解析

21. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2012. 12

新規 p53 標的遺伝子 p53PAD1 による糖鎖制御を介した新しいがん抑制経路の解明

22. 平成 24 年度 個体レベルでのがん研究支援活動 ワークショップ、ポスター発表、2012. 2. 6  
がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がんモデルマウスの作製と解析

23. 第 9 回日米癌合同会議、ポスター発表、2012. 2. 24  
Development of candidate anticancer drug targeting tumor suppressor p53

24. 日本遺伝学会第 85 回大会、ワークショップ発表、2013 年 9 月  
大木理恵子「PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である」

25. The 6th International p63/p73 Workshop、2013 年 9 月  
Rieko Ohki ‘PH domain-only protein PHLDA3; a p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of endocrine tumors’

26. 第 7 2 回日本癌学会学術総会、口頭発表、2013. 10  
大木理恵子「Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である」

27. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
新規 p53 標的遺伝子 p53PAD5 は HSF1 活性化を介してがん化を促進する  
浅野良則、大木理恵子

28. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
江澤一星、大木理恵子  
新規 p53 標的遺伝子 p53PAD1 による糖鎖を介した新たながん抑制経路の解明

29. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
Akt 抑制遺伝子 PHLDA3 は膵b細胞の増殖を抑制する  
斉藤梢、大木理恵子

30. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
PHLDA3 遺伝子と MEN1 遺伝子による膵内分泌腫瘍の抑制機構の解明  
チン・ヨ、大木理恵子

31. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
p53 isoform、D 1stTAD-p53 の機能解析及び標的遺伝子の同定  
鈴木詩織、大木理恵子

32. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
新規 Akt 抑制因子 p53PAD9 の同定と機能解析  
高野悠平、大木理恵子

33. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
新規テロメア結合タンパク質の同定と機能解析～がん化への作用の解明～  
瀧川遥、大木理恵子

34. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
がん抑制遺伝子 PHLDA3 による新規 Akt 抑制メカニズムの解明  
西川雷羅、大木理恵子

35. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
PHLDA3 遺伝子は下垂体腫瘍の新規がん抑制遺伝子である  
峯岸舞子、大木理恵子

36. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
新規 p53 標的遺伝子 p53PAD7 の同定と機能解析  
松下周、大木理恵子

37. 第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013. 12  
がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がんモデルマウスの作製と解析  
大塚旬子、大木理恵子

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大木理恵子 (Rieko Ohki)  
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員  
研究者番号：70356252

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし